

SERVICE PUBLIC FEDERAL  
SANTÉ PUBLIQUE, SECURITE DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENT  
COMMISSION DE BIOLOGIE CLINIQUE  
SERVICE DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE CLINIQUE  
COMITE D'EXPERTS

EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE  
DES ANALYSES EN BIOLOGIE CLINIQUE

**RAPPORT GLOBAL**

**MICROBIOLOGIE / SEROLOGIE / PARASITOLOGIE**

**ENQUETE 02/2003**

Microbiologie (identification)

Aeromonas species  
Escherichia coli  
Corynebacterium diphtheriae  
Staphylococcus aureus

Parasitologie

Plasmodium species

Sérologie

Syphilis  
ASLO

COMITE D'EXPERTS EN MICROBIOLOGIE / SEROLOGIE

ISP-LP (secrétariat) : 02/642.55.21 - FAX : 02/642.56.45  
Dr Kris VERNELEN : 02/642.55.29 - FAX : 02/642.56.45  
E-mail : Kris.Vernelen@iph.fgov.be

Dr BODEUS Monique : 02/764.34.20 - FAX :  
E-mail : bodeus@mblg.ucl.ac.be

Dr CLAEYS Geert : 09/240.36.45 - FAX : 09/240.36.59  
E-mail : geert.claeys@rug.ac.be

Dr CROKAERT Françoise : 02/541.37.00 - FAX : 02/541.32.95  
E-mail : fcrokaer@ulb.ac.be et nathalie.cardinal@bordet.be

Pharm CRUCITTI Tania : 03/247.65.52 - FAX : 03/247.64.40  
E-mail : tcrucitti@itg.be

Dr DE BEENHOUWER Hans : 02/582.76.27 - FAX : 053/72.42.72  
E-mail : hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be

Dr DE GHELDRE Yves : 081/42.32.00 - FAX : 081/42.32.04  
E-mail : yves.degheldre@mont.ucl.ac.be

Dr DEDISTE Anne : 02/538.54.21 - FAX : 02/535.45.30  
E-mail : anne\_dediste@stpierre-bru.be

Dr DELFORGE Marie-Luce : 02/555.34.53 - FAX : 02/555.64.59  
E-mail : mdelforg@ulb.ac.be

Dr JADIN Jean-Marie : 064/23.40.81 - FAX : 064/23.38.47  
E-mail :

Pharm LONTIE Marc : 016/31.01.72 - FAX : 016/31.01.88  
E-mail : marc\_lontie@mchlvwo.be

Dr LUYASU Victor : 010/43.74.63 - FAX : 02/653.91.20  
E-mail : v.luyasu@interweb.be

Dr MAGERMAN Koen : 011/30.97.40 - FAX : 011/30.97.50  
E-mail : koen.magerman@virgajesse.be

Dr NAESENS Anne : 02/477.50.02 - FAX : 02/477.50.15  
E-mail : anne.naessens@az.vub.ac.be

Dr VAN RANST Marc : 016/34.79.08 - FAX : 016/34.79.00  
E-mail : marc.vanranst@uz.kuleuven.ac.be

Dr VERHAEGEN Jan : 016/34.70.73 - FAX : 016/34.79.31  
E-mail : jan.verhaegen@uz.kuleuven.ac.be

Dr VERVOORT Tony : 03/247.64.36 - FAX : 03/247.64.40  
E-mail : tvervoort@poliklin.itg.be

Dr ZISSIS Georges : 02/535.45.30 - FAX : 02/535.46.56  
E-mail : georges\_zissis@stpierre-bru.be

## I. REMARQUES GENERALES

Pour la 2ème enquête du cycle 2003 (enquête 2003/2), le matériel suivant a été expédié le 22 avril 2003.

- 1.1. Quatre échantillons lyophilisés pour identification.  
Pour deux échantillons, les tests de sensibilité ont été demandés.
- 1.2. Deux frottis sanguins pour la recherche de parasites.
- 1.3. Deux échantillons lyophilisés de plasma pour la recherche des anticorps de syphilis et la détection des ASLO.

### NOMBRE DE PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de :

1. Pour les identifications et les antibiogrammes :	216
2. Pour la parasitologie :	205
3. Pour la sérologie :	
Syphilis :	203
ASLO :	206

## II. IDENTIFICATIONS

### 2.1. Culture M/2862 était un *Aeromonas* sp.

Cette bactérie a été isolée à partir des selles d'un patient qui avait une diarrhée. L'identification jusqu'au niveau du genre était demandé.

Dans le passé le genre *Aeromonas* était classé dans la famille Vibrionaceae à côté des genres *Vibrio*, *Photobacterium* et *Plesiomonas*. Les analyses phylogénétiques récentes ont démontré qu'il n'y a que peu de parenté entre *Aeromonas* et les autres Vibrionaceae, de sorte que la nouvelle famille des Aeromonadaceae a été créée ; elle comporte actuellement 14 différentes génotypes (1). Les infections chez l'homme sont surtout provoquées par les génotypes *hydrophila*, *caviae* et *veronii* biotype *sobria*.

#### Infections

Certains *Aeromonas* spp. produisent des enzymes dont les hémolysines, entérotoxines et cytotoxines qui sont responsables de la pathogénèse. Les *Aeromonas* spp. peuvent produire des bactériémies chez des patients immunodéprimés (2). Mais ils sont également responsables d'infections extra-intestinales chez des patients non immunodéprimés : infections de plaies, péritonite, méningite, arthrite et ostéomyélite (3). Les infections de plaies lors de l'utilisation de sangsues en chirurgie et dermatologie sont décrites régulièrement. Il existe une relation symbiotique entre la sangsue et l'*Aeromonas*. La sangsue ne produit pas dans son appareil digestif les enzymes protéolytiques nécessaires à digérer le sang aspiré. Les *Aeromonas* spp. par contre produisent de telles hémolysines.

Les infections de plaie surgissent chez l'homme quand la sangsue régurgite les *Aeromonas* spp. de son tractus intestinal (4).

En outre les *Aeromonas* spp. sont potentiellement responsables d'entérite avec fièvre, de spasmes abdominaux et de diarrhée aqueuse ou glaireuse. *A. veronii* biotype *sobria*, *A. caviae*, *A. jangada* et *A. hydrophila* sont les espèces responsables de l'entérite (5). Elles sont fréquemment à l'origine de la diarrhée des voyageurs.

#### Diagnostic microbiologique

Les *Aeromonas* spp. poussent aisément après incubation en atmosphère normale sur la plupart des milieux non-sélectifs. Pour l'isolation à partir des selles on peut ensemer une gélose au sang avec ampicilline (20 µg/ml) puisque l'*Aeromonas* a une résistance naturelle aux aminopénicillines. La gélose CIN, utilisée par beaucoup de laboratoires pour l'isolation de *Yersinia enterocolitica*, permet également la croissance des *Aeromonas* spp.

Afin d'obtenir une identification correcte, il est nécessaire de différentier d'abord les *Aeromonas* des autres bacilles à Gram négatif, oxydase positifs qui fermentent le glucose, tels que *Plesiomonas* spp. et *Vibrio* spp. Les caractéristiques mentionnées dans le tableau 2.1.1. peuvent être utilisées dans ce but. En outre il est important de mentionner qu'une étude récente a montré que les *Aeromonas* spp. n'acidifient jamais le D-arabitol, le dulcitol, l'érythritol et le xylose en milieu Andrade peptone (6).

L'identification d'*Aeromonas* au niveau de l'espèce n'est pas facile. On reconnaît actuellement l'existence de 14 espèces génotypiques différentes, qui ne peuvent être différenciées que sur base des caractéristiques phénotypiques qui sont révélées à l'aide de réactifs (KCN, pectate, amygdaline, élastase,...), dont un laboratoire de routine ne dispose pas.

Une première alternative est d'utiliser le schéma publié par Abbott et ses collaborateurs (6). Les espèces peuvent être divisées en cinq groupes sur base des résultats des réactions d'ornithinedécarboxylase, de lysinedécarboxylase et d'argininedihydrolase.

Groupe 1: ornithine positif, arginine et lysine négatifs  
*A. veronii* biogroupe *veronii*, *A. allosaccharophila*

Groupe 2: lysine et arginine positifs ornithine négatif  
*A. hydrophila*, *A. veronii* biogroupe *sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* et *A. allosaccharophila*

Groupe 3: lysine, arginine et ornithine négatifs  
*A. caviae*, *A. media* et *A. eucrenophila*

Groupe 4: arginine positif, lysine et ornithine négatifs  
*A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia* et *A. popoffii*

Groupe 5: lysine positif, arginine variable et ornithine négatif  
*A. bestiarum* et *A. salmonicida*

La plupart des souches isolées en clinique appartiennent aux groupes 2 ou 4 avec des espèces qui ne peuvent être différenciés que par des tests supplémentaires.

Une deuxième alternative est d'attribuer l'*Aeromonas* à un des trois complexes courants: les complexes *A. hydrophila* ou *A. caviae* ou *A. sobria*. Le désavantage de cette méthode est que les espèces rare telles que *A. popoffii*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila* et *A. sobria* n'appartiennent en sens strict à aucun des trois complexes.

*A. hydrophila* complexe : *A. hydrophila*, *A. bestiarum* et *A. salmonicida*

A. caviae complexe : *A. caviae*, *A. media* et *A. eucrenophila*

A. sobria complexe : *A. veronii* biogroupe *sobria*, *A. jandaei*, *A. shubertii* et *A. trota*

Comme déjà mentionné ci-dessus les *Aeromonas* spp. possèdent une résistance naturelle aux aminopénicillines. Le profil de résistance aux autres antibiotiques  $\beta$ -lactame, à l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones est variable. (7,8). Les fluoroquinolones sont habituellement conseillées pour le traitement d'entérites graves causées par les *Aeromonas* spp. sensibles. La souche envoyée était cependant résistante aux fluoroquinolones. La résistance au chloramphénicol, aux tétracyclines et au co-trimoxazole varie géographiquement. En outre *A. veronii* biogroupe *sobria* est par exemple fréquemment plus résistant à ces trois antibiotiques que *A. caviae*.

J. Verhaegen, UZ Gasthuisberg, Leuven

Tableau 2.1.1. Caractéristiques du genre *Aeromonas*

	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Vibrio</i>
Croissance sur NaCl 6,5%	-	-	+
Gélatinase	+	-	+
Résistance au Vibriostatique $O_{129}$ (150 $\mu$ g)	+*	-	-
Acidification de			
glucose	+	+	+
inositol	-	+	-
mannitol	V	-	+
sucrose	V	-	V

\* de rares souches d' *A. eucrenophila* sont sensibles  
 - négatif  
 + positif  
 V variable

Tableau 2.1.2 Résultats de l'identification de la souche M/2862 par les 216 laboratoires

<i>A. hydrophila</i>	136	(63,0%)
<i>A. hydrophila/caviae</i>	9	(4,5%)
<i>A. sobria</i>	9	(4,5%)
<i>A. caviae</i>	2	(0,9%)
<i>Aeromonas</i> spp.	54	(25,0%)
<i>E. coli</i> entérohémorragique	1	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	
<i>Yersinia enterocolitica</i> O :9	1	
Pas de croissance	1	
Pas de réponse	2	(0,9%)

Figure 2.1.1. *Aeromonas* sp. (M/2862)

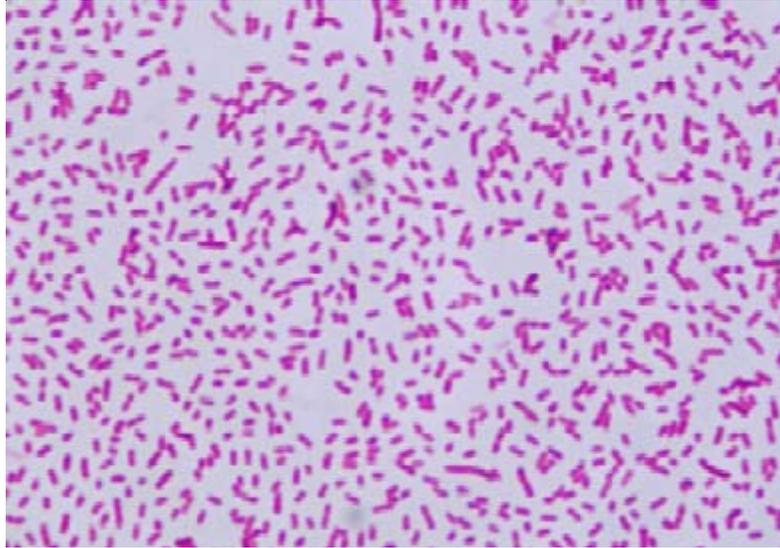
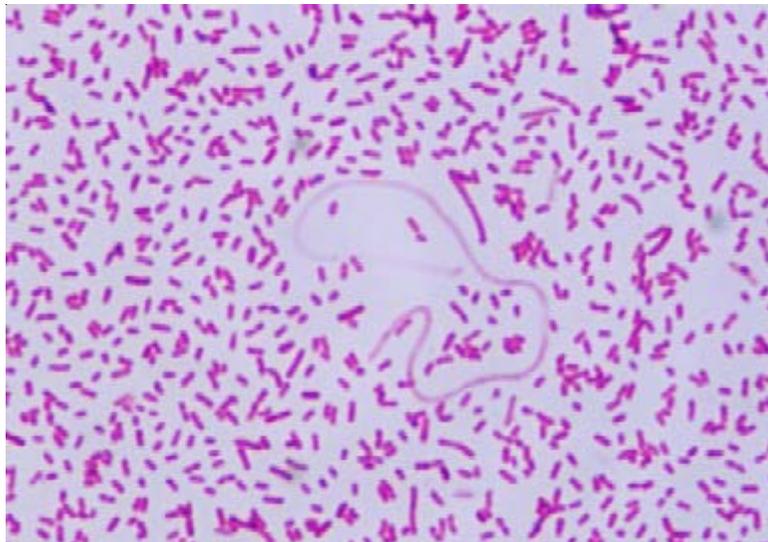


Figure 2.1.2. *Aeromonas* sp. (M/2862)



## REFERENCES

1. Joseph S.W. , Carnahan, A.M.. Update on the Genus *Aeromonas*. ASM News, 2000; 66, 218 - 223.
2. Ko W.C., Lee H.C., Chuang Y.C., et al. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. J. Infect. 2000; 40, 267-273.
3. Gold W.I., Salit I.E. *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. Clin. Infect. Dis. 1993; 16, 69-74.
4. Sartor, C., Limouzin-Perotti, F., Legré, R. et al. Nosocomial infections with *Aeromonas hydrophila* from leeches. Clin. Infect. Dis. 2002; 35, 1-5.
5. Vila J., Ruiz J., Gallardo F., et al. *Aeromonas* spp. and travelers diarrhea : clinical features and antimicrobial resistance. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9, 552- 555.
6. Abbott S.L., Cheung W.K.W., Janda J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J. Clin. Microbiol. 2003; 41, 2348-2357.
7. Moawad M.R., Zeiderman M. *Aeromonas hydrophila* wound infection in elective surgery. J. Wound Care, 2002, 11, 210-211.
8. Goñi-Urriza M., Arpin C., Capdepuy M. et al. Type II Topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 2002; 46, 350-359.

## 2.2. Culture M/4244

Il s'agissait d'une souche d'*Escherichia coli* dont la particularité était la production de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE), justifiant son envoi dans la seconde enquête 2003 de l'évaluation externe de la qualité des analyses de biologie clinique en microbiologie, sérologie et parasitologie.

La détection de la BLSE ne constituait pas un challenge dans cette souche et la majorité des laboratoires (98%) ont rapporté la production de BLSE. Il est important d'insister sur l'augmentation de ce pourcentage puisque « seulement » 91% des laboratoires avaient détecté la BLSE dans une souche d'*E. coli* lors du précédent contrôle en avril 2002. Cette observation est probablement le fruit de plusieurs facteurs incluant la connaissance croissante des différentes techniques de détection des BLSE et de l'importance de rapporter dans le résultat de l'antibiotype cette BLSE, ainsi que l'amélioration de la performance des automates et de leurs systèmes experts.

Lors des précédents rapports globaux, les tests de détection et de confirmation de la production de BLSE chez *E. coli* et *Klebsiella spp* ont été clairement discuté et il ne nous paraît pas nécessaire de réinsister sur ce point. Néanmoins quelques remarques méritent votre attention :

1. Très peu de données sont actuellement disponibles sur la prévalence d'*E. coli* et de *Klebsiella spp* producteurs de BLSE en Belgique. Les études réalisées sur des souches isolées de patients admis dans des unités de soins intensifs rapportent des chiffres variant entre moins d'un % d'*E. coli* et de l'ordre de 30% de *Klebsiella* producteurs de BLSE<sup>1</sup>. Ces données sont confirmées par une étude réalisée en 2000-01 dans les unités de soins intensifs<sup>2</sup>.

2. La modification de valeurs critiques du cefpodoxime pour la détection des BLSE (de 2 à 8 µg/ml ou de 20 à 17 mm)
3. L'intérêt de l'usage combiné de plusieurs tests de détection
4. L'utilité de l'application des tests de confirmation

⇒ 2+3+4 permettent de diminuer la proportion de résultats faussement positifs, donc d'augmenter la spécificité de la détection.

Ainsi, dans une étude récente, Tenover et al ont analysé 131 souches d'*E. coli* ayant un test de détection de BLSE positif selon les critères du NCCLS, à savoir une CMI  $\geq 2$  µg/ml pour au moins une des céphalosporines préconisées<sup>3</sup>.

→ Les tests de confirmation se sont avérés positifs pour 21 (16%) de ces 131 souches. Dans toutes ces 21 souches, la présence de BLSE a été confirmée par PCR et IEF.

→ 59 (45%) des 131 souches avaient un test de screening positif uniquement avec le cefpodoxime (CMI = 2 à 4 µg/ml). Aucune souche n'a montré de positivité dans un des tests de confirmation.

→ En augmentant la valeur critique du cefpodoxime à  $\geq 8$  µg/ml, 45% des résultats faussement positifs basés sur l'usage du cefpodoxime seul ont été éliminés.

5. Les recommandations du NCCLS ne concernent que les *E. coli* et les *Klebsiella* spp<sup>4</sup>. Or de nombreuses publications rapportent la dissémination des BLSE parmi de plus en plus d'*Enterobacteriaceae*<sup>5-9</sup>. Ainsi, en Belgique, environs 66% des souches d'*Enterobacter aerogenes* récoltées pendant l'étude nationale de surveillance en 2000-01 produisaient une BLSE<sup>10</sup>.

- Plusieurs études peuvent nous aider à étayer la détection de BLSE chez *E. aerogenes* :
  - √ Dans le test de synergie initialement décrit par Jarlier et al, le rapprochement des disques à 20 mm centre à centre entre le céfépime et l'association amoxicilline-clavulanate, augmente la sensibilité de détection des BLSE chez *E. aerogenes*<sup>11, 12</sup>.
  - √ La co-résistance à la ceftazidime et à la ciprofloxacine est un excellent marqueur de la production de BLSE, 100% des souches belges ayant ce phénotype étant productrices de BLSE en 2000-01<sup>10</sup>.
- D'autres études ont par ailleurs évalué les performances des automates et de leurs systèmes experts dans la détection des BLSE dans les *Enterobacteriaceae*. Les performances rapportées varient entre 80 et 100% de sensibilité selon les types de machines et selon les souches analysées, avec d'excellentes spécificités. Néanmoins, un nombre plus élevé d'études et de variété de souches analysées sera nécessaire avant de pouvoir tirer des conclusions définitives<sup>13, 14</sup>.
- Deux études réalisées en Belgique ont évalué la performance des doubles disques Oxoïd (De Gheldre) et des doubles E-tests (Laffineur) pour la détection des BLSE au sein d'un même lots d'*Enterobacteriaceae*, incluant des souches d' *E. aerogenes* (n=91), *E. coli* (n=31), *K. pneumoniae* (n=29), *E. cloacae* (n=8), *K. oxytoca* (n=8), *S. marcescens* (n=6), *M. morgani* (n=2), *P. vulgaris* (n=2), *C. freundii*, *P. mirabilis* et *P. stuartii* (n=1 chaque).

Le gold standard pour la production de BLSE était la mise en évidence par PCR des gènes codant pour les BLSE de type TEM et SHV. Les résultats de ces études sont les suivants :

- √ Performance des doubles disques Oxoid ceftazidime/clavulanate (CD02), cefotaxime/clavulanate (CD03) et cefpirome/clavulanate (CD04) : pour *E. coli* et *Klebsiella* spp, les sensibilités (%) / spécificités (%) de CD02, CD03, CD04 et de la combinaison de CD02 ou CD04 sont de 88/92, 90/92, 95/84 et 100/82 ; chez *E. aerogenes* elles sont de 94/100, 4/100, 94/100 et 100/100. Ces données amènent les auteurs à proposer CD02 et CD04 pour la détection des BLSE au sein des *Enterobacteriaceae*, incluant *E. aerogenes*<sup>15</sup>.
  - √ Performance des doubles E-tests ceftazidime/clavulanate (TZ/TZL), cefotaxime/clavulanate (CT/CTL) et céfépime/clavulanate (PM/PML) : pour *E. coli* et *Klebsiella* spp, les sensibilités (%) / spécificités (%) de TZ/TZL, CT/CTL et PM/PML sont de 96/100, 90/81 et 94/81 ; chez *E. aerogenes* elles sont de 4/16, 0/11 et 92/97. Le céfépime apparaît dès lors le plus performant chez *E. aerogenes* et la ceftazidime chez *E. coli* et *Klebsiella* spp<sup>16</sup>.
6. Pour les germes producteurs de BLSE, le NCCLS préconise de répondre résistantes toutes les bêta-lactamines y compris l'aztréonam ; le CA-SFM préconise quant à lui de rendre I toute sensibilité aux bêta-lactamines. Quelle documentation clinique existe-t-il permettant de valider l'application de ces recommandations?

Quelques études ont certes étudié l'évolution clinique de patients infectés par des souches d'*E. coli* ou de *K. pneumoniae* productrices de BLSE et suggèrent une mauvaise évolution chez ceux traités par des céphalosporines de troisième et quatrième génération par rapport aux carbapénèmes<sup>17, 18</sup>. Néanmoins, le nombre de patients évalués ainsi que le type d'infections documentées restent minimes et l'efficacité ou l'échec des céphalosporines semblent néanmoins liés à la CMI.

#### En conclusions

La détection des BLSEs est un problème complexe, qui sera traité de nouveau plus amplement dans un des prochains rapports.

Y. de Gheldre, Mont-Saint-Godinne

## REFERENCES

1. Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C. C. & Goossens, H. (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2191-2197.
2. Glupczynski, Y., Delmée, M., Goossens, H., Ieven, M., Nonhoff, C., Struelens, M., *et al.* (2003). Survey of antimicrobial resistance in Gram-negative rods in Belgian intensive units in 2000-20001. *In Program and Abstracts of the Fourtyone Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2003*. Abstract C2-1972. American society for Microbiology, Washington, DC, USA.
3. Tenover, F. C., Raney, P. M., Williams, P. P., Rasheed, J. K., Biddle, J. W., Oliver, A., *et al.* (2003). Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* **41**, 3142-3146.
4. Standards, N. C. f. C. L. (2002). . *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twelfth informational supplement; M100-S12* NCCLS, Villanova, Pa, USA.
5. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R. & Sirot, J. (2000). A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3177-3179.
6. Neuwirth, C., Siebor, E., Pechinot, A., Duez, J. M., Pruneaux, M., Garel, F., *et al.* (2001). Evidence of in vivo transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 1985-1988.

7. Pagani, L., Migliavacca, R., Pallecchi, L., Matti, C., Giacobone, E., Amicosante, G., *et al.* (2002). Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1549-1552.
8. Canton, R., Oliver, A., Coque, T. M., Varela Mdel, C., Perez-Diaz, J. C. & Baquero, F. (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1237-1243.
9. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 933-951.
10. De Gheldre, Y., Glupczynski, Y., Berhin, C., Struelens, M., De Mol, P. & GDEPIH-GOSPIZ (2002). Epidemiology of *Enterobacter aerogenes* in Belgium: preliminary results of a multicentre survey. *Clinical Microbiology and Infection* **8**, abstract P428.
11. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G. & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases* **10**, 867-878.
12. Tzelepi, E., Giakkoupi, P., Sofianou, D., Loukova, V., Kemeroglou, A. & Tsakris, A. (2000). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* **38**, 542-546.
13. Leverstein-van Hall, M. A., Fluit, A. C., Paauw, A., Box, A. T., Brisse, S. & Verhoef, J. (2002). Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3703-3711.

14. Sanguinetti, M., Posteraro, B., Spanu, T., Ciccaglione, D., Romano, L., Fiori, B., *et al.* (2003). Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1463-1468.
15. De Gheldre, Y., Avesani, V., Berhin, C., Delmee, M. & Glupczynski, Y. (2003). Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **In press**.
16. Laffineur, K., De Gheldre, Y., Berhin, C., Avesani, V. & Glupczynski, Y. (2003). Evaluation of three different Etest ESBL strips for the detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in various *Enterobacteriaceae* species. *In Program and Abstracts of the Fortyone Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2003*. Abstract D-203. American society for Microbiology, Washington, DC, USA.
17. Kim, Y. K., Pai, H., Lee, H. J., Park, S. E., Choi, E. H., Kim, J., *et al.* (2002). Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1481-1491.
18. Paterson, D. L., Ko, W. C., Von Gottberg, A., Casellas, J. M., Mulazimoglu, L., Klugman, K. P., *et al.* (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2206-2212.

### 2.3. Culture M/4313 est un *Corynebacterium diphtheriae*

Pour des raisons de sécurité un *Corynebacterium diphtheriae* type gravis non-toxinogène a été sélectionné pour cette évaluation externe de la qualité. L'identification de cette souche, originaire d'un frottis de gorge, était demandée jusqu'au niveau de l'espèce. Les résultats sont très satisfaisants : 203 des 216 participants ont identifié la souche correctement. Néanmoins, il n'y a que 192 laboratoires qui ont répondu « Oui » à la question s'ils enverraient cette souche en routine à un laboratoire de référence. Ceci est inquiétant vu l'importance de la détermination du caractère toxinogène de *C. diphtheriae*.

La diphtérie est une maladie aiguë bactérienne des voies respiratoires supérieures avec des symptômes de mal de gorge, dysphagie, lymphadénite, fièvre basse, malaise et mal de tête. La présence d'une membrane grise-verte est caractéristique. Les effets systémiques graves de la diphtérie comme la myocardite, la névrite et dégradation rénale, sont causés par l'exotoxine de *C. diphtheriae*, codé par un bactériophage.

Grâce à la vaccination cette maladie a disparu dans les pays avec un standard de vie socio-économique élevé comme la Belgique. Toutefois elle reste endémique dans beaucoup de pays tropicaux et sous-tropicaux. Une épidémie importante a éclaté en Russie et les pays de l'ancienne Union Soviétique dans les années '90, probablement à cause de la diminution de la couverture vaccinale. Il existe peu d'informations concernant les années 2000 mais l'Agence de Santé Publique de la Lettonie a rapporté 91 cas en 2001, dont 4 étaient mortels. Cette situation est inquiétante car la population adulte en Europe occidentale est insuffisamment immunisée contre cette maladie : une étude sérologique, publiée en 1997, a montré que seulement 43% de la population de Flandre est protégée (1).

Récemment il n'y a pas eu de relevé officiel de cas de diphtérie en Belgique mais des cas ont été décrits dans d'autres pays de l'Europe occidentale, souvent après un contact avec l'Europe orientale.

Les laboratoires doivent donc rester vigilants. Il est également important de savoir que *Corynebacterium ulcerans*, qui peut également produire la toxine, est une cause rare de diphtérie après la consommation de lait cru. Finalement il reste à mentionner que les souches non-toxinogènes de *C. diphtheriae* sont isolées sporadiquement à partir d'échantillons cliniques mais que leur signification clinique et épidémiologique reste obscure.

La recherche de la diphtérie sur les frottis de gorge en Belgique est effectuée uniquement sur demande. Ceci est également le cas dans les autres pays d'Europe, à l'exception du Royaume Uni où ce pathogène est recherché de façon systématique. Les échantillons de choix sont un frottis de gorge, avec un prélèvement de membrane si présente ou pour les porteurs asymptomatiques un frottis du nasopharynx. Les écouvillons doivent être ensemencés immédiatement sur les milieux de croissance ou mis dans des milieux de transport (type Amies). Le milieu primaire pour la culture de *C. diphtheriae* est une combinaison de gélose au sang et un milieu à base de tellurite, tel que CTBA (cystine-tellurite blood agar) ou milieu Tinsdale; le milieu Loeffler est déconseillé par certains auteurs à cause de la surcroissance fréquente de la flore commensale. Les colonies suspectes (faible hémolyse sur gélose au sang, colonies grises-noires sur milieux avec tellurite) sont examinées à l'aide d'une coloration de Gram, et des tests de catalase et pyrazinamidase. Les souches qui ont une morphologie caractéristique à la coloration de Gram (bacilles à Gram positif avec extrémité en palissade ou écriture cunéiforme) et qui sont catalase et pyrazinamidase positives seront identifiées de façon plus complète.

Le tableau 2.3.1. reprend les caractéristiques biochimiques pertinentes. Différents systèmes commerciaux (p. ex. API Coryne) sont fiables pour identifier les corynebactéries potentiellement toxigènes.

Il est essentiel que chaque isolat suspect soit examiné pour la production de toxine et ceci sans attendre une identification définitive. Le laboratoire de référence utilise une technique de PCR. Les isolats positifs devront cependant être envoyés à un laboratoire de référence international afin de confirmer la production de la toxine car quelques souches présentant une mutation introduisant un codon stop dans le gène ont été décrites.

Figure 2.3.1. *Corynebacterium diphtheriae*

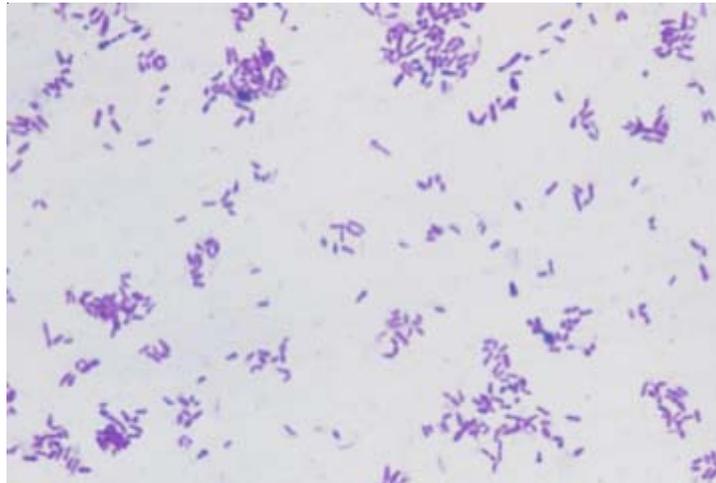


Tableau 2.3.1. : Differentiation des Corynebactéries potentiellement toxigènes.

	<i>C. diphtheriae</i> biotype :				<i>C. ulcerans</i>	<i>C. pseudo-tuberculosis</i>
	<i>mitis</i>	<i>belfanti</i> <sup>(1)</sup>	<i>intermedius</i>	<i>gravis</i>		
uréase	0	0	0	0	+	+
nitrate	+	0	+	+	0	V
glucose*	+	+	+	+	+	+
maltose*	+	+	+	+	+	+
glycogène*	0	0	0	+	+	0
sucrose*	0	0	0	0	0	V
esculine	0	0	0	0	0	0
phosphatase alcaline	0	0	0	0	+	V
CAMP**	0	0	0	0	INV***	INV***
hémolyse β (BA)	souvent faible	souvent faible	aucune	parfois faible	+	+
amidon (MH)	0	0	0	+	+	0
dextrine*	0	+	+	+	/	/
lipophile	0	0	+	0	0	0
BA après 48h (diamètre des colonies)	>1mm	>1mm	<1mm	>1mm	/	/
Gram à partir de Loeffler	Long, droit, pléomorphe		très pléomorphe	court, coccoïde	/	/

(1) *C. diphtheriae* biotype *belfanti* is est toujours négatif pour la toxine

\* + 2 gouttes de sérum de cheval si le germe est lipophile.

\*\* utiliser *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

\*\*\* réaction Camp inversé (la double zone d'hémolyse autour du Staphylocoque est diminuée)

0 négatif

+

V variable

BA blood agar (gélose au sang)

MH Muller Hinton

D. Pierard, AZ VUB, Jette

## REFERENCES

1. Mathei et al., Diphtheria immunity in Flanders, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997, 16: 631-6

## 2.4. Culture M/4370 était un Staphylocoque doré résistant à la méthicilline (MRSA)

Si l'identification du Staphylocoque doré ne pose généralement pas de problèmes, il faut attirer l'attention des laboratoires sur la lecture de la sensibilité à l'Oxacilline qui présente parfois des difficultés ; or le dépistage des porteurs est capital pour prévenir transmission intra hospitalière de la bactérie qui se fait le plus souvent par l'intermédiaire d'autres porteurs de MRSA (patients ou personnel soignant).

La résistance des Staphylocoques à l'Oxacilline est une résistance génomique ; il s'agit d'un îlot de résistance chromosomique appelé « Staphylococcal cassette chromosome *mec* » (*SCCmec*)

### Antibiogramme des staphylocoques par diffusion en gélose :

Milieu : Mueller Hinton 2

Inoculum : 0.5 McFarland

T° d'incubation : 35°C

Durée d'incubation : 24 heures complètes.

Ces conditions sont à respecter strictement sous peine de répondre des faux négatifs.

Le dépistage de la résistance peut se faire

- par diffusion en agar à l'aide d'un disque d'Oxacilline à 1 µg/ml
- avec une gélose de type Oxa-screen (gélose Mueller Hinton + 4%NaCl + 6 µg/ml d'Oxacilline). Cette gélose présente un risque de faux négatifs car les « small colony variants » peuvent ne pas pousser sur ce milieu.
- avec un automate de nouvelle génération

Des études récentes montrent que l'utilisation d'un disque de cefoxitine 30 µg serait plus sensible et plus spécifique pour détecter de bas niveaux de résistance chez les MRSA hétérorésistants. La présence d'un MRSA serait à suspecter si la zone d'inhibition est inférieure à <20mm. Ce test doit encore être évalué à grande échelle avant d'entrer dans les procédures de routine.

La résistance à l'Oxacilline implique la résistance à toutes les β lactamines avec ou sans inhibiteur de β lactamases, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Il est inutile de tester ces composés car il existe de fausses sensibilités in vitro.

#### Confirmation de la résistance à l'Oxacilline :

- Gold standard : détection du gène *mecA* par PCR (se fait dans la plupart des Centres de Diagnostic Moléculaires en Belgique). Les CDM effectuent en outre une confirmation de l'identification à l'aide d'un autre marqueur (Nuc ou Fem).
- Détection de la présence de PBP2a par une technique au latex (Denka)
- Eventuellement avec une gélose Oxa-screen (restrictions cf. supra)

Il est indispensable de confirmer la sensibilité du staphylocoque doré si l'antibiogramme classique montre une sensibilité à l'Oxacilline mais une résistance à l'un des antibiotiques suivants : 4-fluoroquinolone, aminoglycoside ou tétracycline.

Au début des années 1990, le principal clone de MRSA (appartenant au groupe A) isolé dans les hôpitaux belges était aussi multi résistant aux antibiotiques (gentamicine, fluoroquinolones, macrolides, lincosamine) ; mais depuis quelques années on observe l'émergence de plus en plus importante d'un nouveau clone (appartenant au groupe B) qui est beaucoup plus sensible (Tableaux 2.4.1 et 2.4.2 ).

Détermination de la sensibilité aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine)

La prévalence des *s. aureus* résistants ou à sensibilité intermédiaire aux glycopeptides est très faible en Belgique; la recherche de telles souches n'est donc utile que s'il existe une suspicion clinique de résistance.

La méthode de diffusion en gélose avec des disques d'antibiotiques ainsi que la dilution avec des automates de première génération ne sont pas fiables.

Le screening peut se faire par utilisation

- d'une gélose BHI (Brain Hart Infusion) contenant 6 µg/ml de vancomycine.
- d'une gélose Mueller Hinton 2 contenant 5 µg/ml de vancomycine.

L'une de ces géloses est ensemencée avec un spot de 10 µl d'une suspension 0.5 McFarland de *S.aureus* et incubée à 35°C pendant 24 heures.

Toute croissance doit être confirmée par une CMI.

Tableau 2.4.1 Sensibilité des différents clones de MRSA

	Groupe A1	Groupe A20	Groupe B
Gentamicine	R	S	S
Tobramycine	R	R	S
Rifampicine	R	R	S
Erythromycine	R	R	variable
Clindamycine	R	R	S
Ciprofloxacine	R		R

Tableau 2.4.2 Répartition des clones de MRSA dans le hôpitaux belges

<b>Année</b>	<b>% approximatif groupe A</b>	<b>% approximatif groupe B</b>
1992	> 75%	5%
1995	< 75%	15 à 20%
1997	< 50%	35%
2001	25%	50%

## REFERENCES

1. NCCLS Document M100-S13 : Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing 13<sup>th</sup> informational supplement (for use with M2-A8). Janvier 2003
2. Document de travail du GDEPIH- GOSPIZ présenté lors du symposium de la société à Bruxelles le 29/04/2003.

### III. RESULTATS DES IDENTIFICATIONS (N=216)

Les identifications correctes ou acceptables sont soulignées..

#### 3.1. Culture M/2862 *Aeromonas species* (selles) N = 216

<u><i>Aeromonas hydrophila</i></u>	136	(63,0 %)
<u><i>Aeromonas hydrophila/caviae</i></u>	9	(4,2 %)
<i>Aeromonas sobria</i>	9	(4,2 %)
<i>Aeromonas caviae</i>	2	(0,9 %)
<u><i>Aeromonas species</i></u>	54	(25,0 %)
<i>E. coli</i> entérohémorragique	1	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	
<i>Yersinia enterocolitica</i> 09	1	
Pas de croissance	1	
Pas dans le domaine d'application	1	
Pas de réponse	1	

#### 3.2. Culture M/4244 *Escherichia coli* ( aspiration bronchique) N = 216

<u><i>Escherichia coli</i></u>	215	(99,5 %)
Pas de réponse	1	

A la question s'il s'agissait d'un producteur BLSE, les réponses étaient les suivantes :

Oui	212	(98,1 %)
Inconnu	3	
Pas de réponse	1	

**3.3. Culture M/4313 *Corynebacterium diphtheriae***  
(frottis de gorge)  
**N = 216**

<u><i>Corynebacterium diphtheriae</i></u>	117 (54.2%)
<u><i>Corynebacterium diphtheriae gravis</i></u>	86 (39.8%)
<i>Corynebacterium diphtheriae mitis</i>	1
<i>C. diphth. gravis</i> + <i>C. diphth. intermedius</i>	1
<i>Corynebacterium species</i>	9
<i>Corynebacterium accolens</i>	1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> + <i>E. coli</i>	1

A la question si la souche était envoyée en routine à un laboratoire de référence, les réponses seraient les suivantes:

Oui	192 (88.9%)
Non	13
Pas d'application	1
Pas de réponse	10

La réponse 'pas d'application' a été formulée par le laboratoire d'une société pharmaceutique.

**3.4 Culture M/4370 *Staphylococcus aureus* ( plaie)**  
**N = 216**

<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	214 (99.1%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
Pas de réponse	1

94 des 214 participants ayant répondu *S. aureus* ont mentionné explicitement MRSA.

#### IV. ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme type a été réalisé par plusieurs experts selon les deux méthodes les plus couramment utilisées et pouvant servir de référence : méthode de diffusion par disques selon NCCLS et ROSCO (NEO-SENSITABS).

##### 4.1. Culture M/4244 (*E. coli*)

Nombre de participants= 216

Certains laboratoires ont utilisé plus d'une technique pour quelques antibiotiques. Il n'y a qu'un résultat par laboratoire qui a été repris dans le tableau 4.1.1. Dans la plupart des cas le même résultat a été obtenu par le même laboratoire pour le même antibiotique avec les différentes techniques. Un laboratoire a mentionné tant pour l'amoxicilline-acide clavulanique que pour le céfépime le résultat I/R pour la méthode de diffusion (avec tablettes ROSCO) et le résultat R pour la méthode de dilution. Un autre laboratoire a mentionné pour l'amoxicilline-acide clavulanique pour la méthode de diffusion (avec tablettes ROSCO) le résultat S et le résultat R pour Vitek 2. Un troisième laboratoire a mentionné pour le céfépime le résultat S pour la méthode de diffusion (avec disques en papier) et le résultat R pour Vitek 2. Tous ces laboratoires ont été classés dans la catégorie 'R' dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.1.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/4244 (*E.coli*)

	Résultat attendu	S	I	R
Co-trimoxazole	R	-	-	210
Ciprofloxacine	R	-	-	201
Amoxicilline <sup>1</sup>	R	-	-	138
Amoxicilline-acide clavulanique	R	42	78	95
Piperacilline	R	3	1	145
Méropénem	S	164	-	-
Céfuroxime	R	-	-	209
Céfotaxime	R	1	2	170
Céfépime	R	8	38	117
Gentamicine	R	3	3	192

<sup>1</sup> Résultats déduits à partir de l'ampicilline dans un certain nombre de cas

Lorsque la méthode complète était reprise, nous avons déterminé le diamètre médian, minimum et maximum pour les méthodes de diffusion sur disque selon NCCLS et ROSCO (NEO-SENSITABS).

Certains laboratoires n'utilisent pas la charge appropriée ou ne mentionnent pas la charge des disques utilisés ; ces laboratoires ne sont pas pris en compte pour le calcul des médianes, minima et maxima.

Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires rapportent un diamètre égal à « zéro » dans le cas où il y a une croissance jusqu'au bord du disque. Il est toutefois conseillé de ne pas répondre « zéro » dans ces cas, mais de donner le diamètre du disque. Dans ce cas également ces résultats n'ont pas été pris en compte pour les calculs suivants.

Tableau 4.1.2. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion par disques selon NCCLS pour l'échantillon M/4244 (*E.coli*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs ayant mentionné la charge (nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Co-trimoxazole	34 (49)	1.25/23.75	6	6-6	0	0	49
Ciprofloxacine	43 (47)	5	6	6-7	0	0	47
Amoxicilline-acide clavuniqu	22 (50)	20/10	14	6-16	1	16	33
Pipéracilline	23 (29)	100	6,5	6-22	1	0	28
Méropénem	33 (36)	10	30	21-34	36	0	0
Céfuroxime	44 (47)	30	6	6-7	0	0	47
Céfotaxime	35 (39)	30	9	6-12	0	0	39
Céfépime	27 (31)	30	17	11-20	2	1	28
Gentamicine	41 (44)	10	8	6-11	0	0	44

Tableau 4.1.3. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion par disques selon ROSCO pour l'échantillon M/4244 (*E.coli*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs ayant mentionné la charge (nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I	I/R	R
Co-trimoxazole	85 (85)	5.4/240	9	8-10	0	0	0	85
Ciprofloxacine	56 (76)	10	9	9-10	0	0	0	76
Amoxicilline	29 (55)	30	9	8-10	0	0	0	55
Amoxicilline-acide clavuniqu	90 (90)	30/15	20	16-24	26	19	1	44
Pipéracilline	37 (57)	100	9	9-26	0	0	0	57
Méropénem	34 (57)	10	33	23-39	57	0	0	0
Céfuroxime	86 (86)	60	9	8-10	0	0	0	86
Céfotaxime	37 (61)	30	12	9-29	0	0	0	61
Céfépime	62 (62)	30	17	10-23	1	11	1	49
Gentamicine	57 (76)	40	16	10-19	2	1	0	73

Les différences entre NCCLS et ROSCO sont significatives pour l'amoxicilline-acide clavulanique ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus avec Vitek sont repris dans 4.1.4.

Tableau 4.1.4. Résultats obtenus avec Vitek pour l'échantillon M/4244 (*E.coli*)

Antibiotique	Vitek 1					Vitek 2				
	Résultat final			Dilution mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionnés cette dilution (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final			Dilution mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionnés cette dilution (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R			S	I	R		
Co-trimoxazole	0	0	12	>320	7 (12)	0	0	38	>320	29 (38)
Ciprofloxacine	0	0	13	>4	8 (13)	0	0	37	>4	28 (37)
Amoxicilline-acide clavuniqué	2	9	2	<8	8 (13)	0	32	6	16	26 (38)
Pipéracilline	0	0	1	>256	1 (1)	0	0	38	>128	29 (38)
Méropénem	10	0	0	<2	7 (10)	37	0	0	<0.25	28 (37)
Céfuroxime	0	0	13	>32	8 (13)	0	0	37	>64	28 (37)
Céfotaxime	0	0	13	>64	6 (13)	0	0	37	>64	28 (37)
Céfépime	0	1	9	16	4 (10)	3	24	11	2 et 4	20 (38)
Gentamicine	0	2	11	>16	7 (13)	0	0	38	>16	29 (38)

Dans la plupart des cas la « dilution mentionnée le plus fréquemment » est la seule reprise par les participants. Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires ne mentionnent toutefois pas cette dilution. Généralement pour la plupart des antibiotiques les réponses ne diffèrent pas plus d'une dilution.

Toutefois:

- pour le céfépime:

- Vitek 1: outre la dilution mentionnée le plus fréquemment de 16 mg/l (mentionnée 4 fois), les dilutions 8 mg/l (une fois) et > 32 mg/l (2 fois) ont été mentionnées comme résultat final ; les autres utilisateurs n'ont pas mentionné la dilution retrouvée. Il est à noter que la dilution de 16 mg/l correspond a un résultat « brut » de « I » ; sur base du système expert, ce résultat est changé en « R » pour le résultat final.

- Vitek 2: outre les dilutions mentionnées le plus fréquemment de 2 et 4 mg/l (mentionnées 10 fois chacune), les dilutions 8 mg/l (quatre fois), 32 mg/l (trois fois) et > 64 mg/l (une fois) ont également été mentionnées comme résultat final ; les autres utilisateurs n'ont pas mentionné la dilution retrouvée. Il est à noter que les dilutions de 2, 4 et 8 mg/l correspondent à un résultat « brut » de « S » ; sur base du système expert, certains utilisateurs ont changé ce résultat en « I » ou « R » pour le résultat final. On n'a toutefois pas pu établir une relation directe entre les dilutions en dessous de 32 mg/l et le résultat final:

Dilution (mg/l)	Résultat final (n)		
	S	I	R
2	7	2	1
4		7	3
8		3	
32			3
> 64			1

- pour l'amoxicilline-acide clavulanique la dilution < 8 mg/l correspond à un résultat « brut » de « S » ; sur base du système expert ce résultat est changé en « I » pour le résultat final.

Les résultats obtenus avec la méthode ATB sont repris dans le tableau 4.1.5. La plupart des laboratoires ont mentionné seulement le résultat (S, I ou R) et n'ont pas mentionnés les valeurs obtenues.

Tableau 4.1.5. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon (*E.coli*)

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Co-trimoxazole	0	0	20
Ciprofloxacine	0	0	21
Amoxicilline-acide clavulanique	11	4	6
Pipéracilline	1	0	16
Méropénem	18	0	0
Céfuroxime	0	0	22
Céfotaxime	1	2	16
Céfépime	3	1	14
Gentamicine	0	0	20

Il reste à mentionner que:

- quatre laboratoires ont déterminé la résistance au céfépime avec le test E, deux laboratoires ont utilisé cette technique pour la détermination de la résistance à l'amoxicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique et au méropénem ; un laboratoire a déterminé la résistance à la céfuroxime, à la céfotaxime et à la gentamicine avec cette technique
- deux laboratoires ont déterminé la résistance au co-trimoxazole, à la ciprofloxacine, à l'amoxicilline-acide

- clavulanique, à la pipéracilline, au méropénem, à la céfuroxime, au céfépime et à la gentamicine avec la méthode de microdilution ; un de ces deux laboratoires a utilisé cette technique pour déterminer la résistance à l'amoxicilline et à la céfotaxime;
- deux laboratoires ont déterminé la résistance au co-trimoxazole, à la ciprofloxacine, à l'amoxicilline-acide clavulanique, au méropénem, à la céfuroxime, à la céfotaxime, au céfépime et à la gentamicine sur Phoenix ; un de ces deux laboratoires a utilisé cette technique pour déterminer la résistance à l'amoxicilline et à la pipéracilline
  - un laboratoire a déterminé la résistance au co-trimoxazole, à la ciprofloxacine, à l'amoxicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique et à la gentamicine avec la méthode de dilution sur agar
  - un laboratoire a déterminé la résistance au co-trimoxazole, à la ciprofloxacine, à l'amoxicilline, à la pipéracilline, à la céfuroxime, à la céfotaxime, et à la gentamicine avec la méthode Sensititre
  - un laboratoire a déterminé la résistance au co-trimoxazole, à l'amoxicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, à la pipéracilline, au méropénem, à la céfuroxime, à la céfotaxime, au céfépime et à la gentamicine sur galerie Mini Api

Enfin, il y a 7 laboratoires qui n'ont pas mentionné la méthode utilisée pour un ou plusieurs antibiotiques.

#### 4.2. Culture M/4370 (S.aureus)

Nombre de participants= 216

Certains laboratoires ont utilisé plus d'une technique pour quelques antibiotiques. Il n'y a qu'un résultat par laboratoire qui a été repris dans le tableau 4.2.1. Dans la plupart des cas le même résultat a été obtenu par le même laboratoire pour le même antibiotique avec les différentes techniques. Un laboratoire a mentionné pour l'oxacilline le résultat S pour la méthode de diffusion (avec tablettes ROSCO) et le résultat R pour la méthode de dilution. Un autre laboratoire a mentionné pour l'amikacine le résultat S pour la méthode de diffusion (avec tablettes ROSCO) et le résultat R pour Vitek 2. Ces deux laboratoires ont été classés dans la catégorie 'R' dans le tableau ci-dessous.

Un troisième laboratoire a mentionné pour la gentamicine le résultat I pour la méthode de diffusion (avec tablettes ROSCO) et le résultat S pour la détermination de la CMI. Un quatrième laboratoire a mentionné pour la ciprofloxacine le résultat I pour la méthode de diffusion et le résultat S pour la détermination de la CMI. Etant donné que nous pouvons supposer qu'en routine ces laboratoires répondront plus tôt le résultat de la CMI que celui de la méthode de diffusion, ces laboratoires ont été classés dans la catégorie 'S' dans le tableau ci-dessous.

En outre il y a un laboratoire qui a répondu pour la gentamicine le résultat I/S ; ce laboratoire a été classé dans la catégorie 'I' dans le tableau ci-dessous.

Il est à noter qu'un laboratoire a déterminé l'antibiogramme brut pour tous les antibiotiques, mais n'a pas répondu l'antibiogramme final pour l'érythromycine, le co-trimoxazole, l'amikacine et la ciprofloxacine puisque en routine ce laboratoire ne donne des résultats pour ces antibiotiques que pour S. aureus dans les urines.

Finalement il y a un laboratoire qui a obtenu le résultat 'R' pour la vancomycine avec la méthode de diffusion et a répondu qu'afin de pouvoir déterminer la sensibilité de façon correcte il faut effectuer la détermination de la CMI.

Tableau 4.2.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/4370 (*S.aureus*)

	Résultat attendu	S	I	R
Oxacilline	R	20	-	194
Pénicilline	R	2	-	199
Erythromycine	S	187	13	7
Clindamycine	S	191	3	5
Co-trimoxazole	S	204	1	2
Vancomycine	S	196	2	5
Gentamicine	S	183	8	4
Amikacine	S	101	3	28
Ofloxacine	S	123	1	2
Ciprofloxacine	S	154	5	4

Lorsque la méthode complète était reprise, nous avons déterminé le diamètre médian, minimum et maximum pour les méthodes de diffusion sur disque selon NCCLS et ROSCO (NEO-SENSITABS).

Certains laboratoires n'utilisent pas la charge appropriée ou ne mentionnent pas la charge des disques utilisés ; ces laboratoires ne sont pas pris en compte pour le calcul des médianes, minima et maxima.

Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires rapportent un diamètre égal à « zéro » dans le cas où il y a une croissance jusqu'au bord du disque. Il est toutefois conseillé de ne pas répondre « zéro » dans ces cas, mais de donner le diamètre du disque.

Dans ce cas également ces résultats n'ont pas été pris en compte pour les calculs suivants.

Tableau 4.2.2. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion par disques selon NCCLS pour l'échantillon M/4370 (*S.aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I <sup>1</sup>	R	*2
Oxacilline	32 (43)	1	7,5	6-22	2	0	41	
Penicilline	34 (47)	10	12	6-31	0	0	47	
Erythromycine	42 (47)	15	25	20-35	39	6	2	
Clindamycine	37 (42)	2	25	19-28	38	2	2	
Co-trimoxazole	41 (50)	1.25/23.75	26	22-32	50	0	0	
Vancomycine	36 (41)	30	16	12-27	37	1	2	1
Gentamicine	36 (41)	10	20	14-29	38	1	2	
Amikacine	36 (39)	30	18	6-26	29	2	8	
Ofloxacine	21 (24)	5	23	18-28	22	1	1	
Ciprofloxacine	38 (43)	5	23	18-32	37	5	1	

<sup>1</sup> Le résultat mentionné dans le tableau sous « I » pour la gentamicine avait été répondu comme « I/S »

<sup>2</sup> Un laboratoire a obtenu le résultat 'R' pour la vancomycine avec la méthode de diffusion et a répondu qu'afin de pouvoir déterminer la sensibilité de façon correcte il faut effectuer la détermination de la CMI.

Tableau 4.2.3. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion par disques selon ROSCO pour l'échantillon M/4370 (*S.aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I	R	*1
Oxacilline	78 (87)	1	14	9-30	17	0	70	
Pénicilline	64 (86)	5	11	9-37	2	0	84	
Erythromycine	58 (89)	78	30	24-44	82	3	3	1
Clindamycine	65 (84)	25	31	14-38	81	1	2	
Co-trimoxazole	58 (89)	1.25/23.75	34	25-47	87	1	0	1
Vancomycine	38 (82)	5	17	11-22	38	0	0	
	31	70	20	10-23	28	1	2	
Gentamicine	66 (81)	40	26	20-30	73	7	1	
Amikacine	47 (81)	40	23	9-27	68	1	11	1
Ofloxacine	33 (52)	10	26	22-32	52	0	0	
Ciprofloxacine	57 (78)	10	25	20-32	76	0	1	1

<sup>1</sup> Un laboratoire a déterminé l'antibiogramme brut pour tous les antibiotiques, mais n'a pas répondu l'antibiogramme final pour l'érythromycine, le co-trimoxazole, l'amikacine et la ciprofloxacine puisque en routine ce laboratoire ne donne des résultats pour ces antibiotiques que pour *S. aureus* dans les urines.

Les différences entre NCCLS et ROSCO sont significatives pour l'oxacilline ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus avec Vitek sont repris dans le tableau 4.2.4.

Tableau 4.2.4. Résultats obtenus avec Vitek pour l'échantillon M/4370 (*S. aureus*)

Antibiotique	Vitek 1					Vitek 2				
	Résultat final			Dilution mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionné cette dilution (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final			Dilution mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionné cette dilution (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R			S	I	R		
Oxacilline	0	0	13	>8	9 (13)	0	0	38	>4	24 (38)
Pénicilline	0	0	4	>16	2 (4)	0	0	38	>0.5	28 (38)
Erythromycine	12	0	1	<0.5	8 (13)	38	0	0	<0.25	29 (38)
Clindamycine	13	0	0	<0.5	8 (13)	38	0	0	<0.25	29 (38)
Co-trimoxazole	11	0	1	<10	8 (12)	38	0	0	<10	29 (38)
Vancomycine	13	0	0	2	4 (13)	38	0	0	<1	29 (38)
Gentamicine	12	0	1	<2	7 (13)	38	0	0	<0.5	29 (38)
Amikacine	-	-	-	-	-	1	0	8	>32	3 (9)
Ofloxacine	3	0	0	<4	1 (3)	38	0	0	<0.5	29 (38)
Ciprofloxacine	12	0	1	<0.5	8 (13)	11	0	0	-	- (11)

Dans la plupart des cas la « dilution mentionnée le plus fréquemment » est la seule reprise par les participants (toutefois pour la pénicilline il y a un laboratoire qui a répondu < 0.25 mg/l). Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires ne mentionnent toutefois pas cette dilution

Les 5 résultats qui sont divergents des résultats de la majorité d'utilisateurs de ces méthodes (« R » avec Vitek 1 pour l'érythromycine, le co-trimoxazole, la gentamicine et la ciprofloxacine ; « S » avec Vitek 2 pour l'amikacine) ont été répondu par des laboratoires qui n'ont pas mentionné la dilution retrouvée. Il est à noter que pour l'érythromycine, la gentamicine et la ciprofloxacine le résultat « brut » était « S » et que ce résultat a été changé en « R » pour le résultat final (dans le cas de l'érythromycine sur base du système expert).

Les résultats obtenus avec la méthode ATB sont repris dans le tableau 4.2.5. La plupart des laboratoires ont mentionné seulement le résultat (S, I ou R) et n'ont pas mentionnés les valeurs obtenues.

Tableau 4.2.5. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/4370 (*S.aureus*)

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Oxacilline	0	0	19
Pénicilline	0	0	19
Erythromycine	15	3	1
Clindamycine	18	0	1
Co-trimoxazole	16	0	1
Vancomycine	18	0	1
Gentamicine	18	0	0
Amikacine	-	-	-
Ofloxacine	8	0	0
Ciprofloxacine	7	0	0

Tableau 4.2.6. Résultats obtenus avec les milieux oxascreen et vancoscreen pour l'échantillon M/4370 (*S.aureus*)

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Oxacilline	1	0	15
Vancomycine	8	0	0

Tableau 4.2.7. Résultats obtenus avec le test E pour l'échantillon M/4370 (*S.aureus*)

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Oxacilline	1	0	7
Pénicilline	0	0	3
Erythromycine	-	-	-
Clindamycine	-	-	-
Co-trimoxazole	-	-	-
Vancomycine	9	0	0
Gentamicine	1	0	0
Amikacine	1	0	1
Ofloxacine	-	-	-
Ciprofloxacine	1	0	0

Il reste à mentionner que:

- deux laboratoires ont déterminé la résistance à l'oxacilline, à la pénicilline, à l'érythromycine, à la clindamycine, au co-trimoxazole, à la vancomycine, à la gentamicine et à la ciprofloxacine avec la méthode de microdilution
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'oxacilline, à la pénicilline, à l'érythromycine, à la clindamycine, au co-trimoxazole, à la vancomycine, à la gentamicine et à la ciprofloxacine sur Phoenix
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'oxacilline, à la pénicilline, à l'érythromycine, à la clindamycine, au co-trimoxazole, à la vancomycine, à la gentamicine, à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine avec la méthode Sensititre
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'oxacilline, à la pénicilline, à l'érythromycine, à la clindamycine, au co-trimoxazole, à la vancomycine, à la gentamicine et à la ciprofloxacine sur galerie Mini Api

Finalement il y a 11 laboratoires qui n'ont pas mentionné la méthode utilisée pour un ou plusieurs antibiotiques.

**Remarque sur l'échantillon M/4086 de l'enquête 2003/1**

Seules les réponses *Enterococcus faecium* et *Enterococcus species* ont été retenues comme correctes ou acceptables. La réponse *Streptococcus faecium* n'a pas été retenue.

Dans la septième édition du 'Manual of clinical microbiology' (eds. P.R. Murray et. al.) (1999), il est clairement indiqué qu'*Enterococcus* doit être considéré comme un genre différent de *Streptococcus* ("Genetic evidence that *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* were sufficiently different from the other members of the genus *Streptococcus* to merit a separate genus, as originally proposed by Kalina, was provided by Schleiffer and Killper-Balz in 1984. It has been 15 years since this proposal, and it is generally accepted that the genus *Enterococcus* is valid." (p. 297)).

Il nous semblait donc logique de ne plus accepter la réponse *Streptococcus faecium*.

## V. PARASITOLOGIE

### 5.1. Les échantillons

Deux frottis sanguins ont été envoyés aux laboratoires.

L'échantillon P/4151 était accompagné des informations cliniques suivantes :

Un Burkinabé de 21 ans habite depuis trois ans en Belgique. Après un voyage dans son pays d'origine il est de retour en Belgique depuis 3 semaines. Au moment de la prise de sang il souffre de fièvre, il a des frissons et une diarrhée.

Cet échantillon contenait des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum*. Sur certaines lames il y avait également de rares schizontes.

L'échantillon P/4165 était accompagné des informations cliniques suivantes :

Un homme de 45 ans fait un voyage en Amérique du Sud. Depuis son retour, son état général est mauvais, il a de la fièvre et se sent fatigué. Durant son séjour en Amérique, il a pris les médicaments prophylactiques appropriés.

Cet échantillon était négatif.

### 5.2. Les résultats

#### 5.2.1 Echantillon P/4151

Au total 208 laboratoires ont participé à l'enquête. 203 laboratoires ont mentionné la présence de *Plasmodium*. Trois laboratoires ont mentionné la présence de deux espèces différentes, un laboratoire a mentionné la présence de trois espèces différentes. Cinq autres laboratoires ont mentionné la possibilité d'un mélange.

Un laboratoire a mentionné la présence d'*Enteromonas hominis*, un autre la présence de microsporidies. Il est possible que ces laboratoires ont utilisé d'anciens codes. Nous voulons insister sur l'intérêt d'utiliser les codes les plus récents.

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5.2.1. Résultats des parasites retrouvés dans l'échantillon P/4151

Parasite	Nombre
<i>P.falciparum</i>	186
<i>P.falciparum</i> + <i>P.malariae</i>	3
<i>P.falciparum</i> + <i>P.malariae</i> + <i>P.ovale</i>	1
<i>P.malariae</i>	7
<i>P.vivax</i>	2
<i>P.ovale</i>	1
<i>Plasmodium species</i>	3
<i>Enteromonas hominis</i>	1
Microsporidia	1
<b>Total</b>	<b>205</b>

Les 190 laboratoires qui ont trouvé *P. falciparum*, seul ou en combinaison avec d'autres espèces de *Plasmodium*, ont mentionné 5 stades d'évolution : 176 laboratoires ont mentionné un stade, 13 ont mentionné 2 stades et un laboratoire a mentionné trois stades.

Tabel 5.2.2. Stades mentionnés pour *P. falciparum* dans l'échantillon P/4151

Stade	Nombre
Trophozoïte	181
Schizonte jeune	7
Schizonte âgé	7
Gamétocyte	5
Forme adulte	1
Non précisé	4
<b>Total</b>	<b>205</b>

Si plus d'un stade d'évolution était mentionné, il s'agissait des combinaisons suivantes :

Tableau 5.2.3. Combinaisons des stades pour *P. falciparum* dans l'échantillon P/4151

Combinaison	Nombre
Trophozoïte + schizonte âgé	4
Trophozoïte + schizonte jeune	4
Trophozoïte + gamétocyte	2
Trophozoïte + forme adulte	1
Schizonte jeune + schizonte âgé	2
Trophozoïte + schizonte âgé + gamétocyte	1
<b>Total</b>	<b>14</b>

En d'autres mots : trois laboratoires ont mentionné uniquement la présence de schizontes : 2 laboratoires la combinaison de schizontes jeunes et âgés et un uniquement de schizontes jeunes.

Cinq laboratoires ont mentionné d'envoyer l'échantillon en routine au laboratoire de référence, principalement pour des raisons de confirmation de l'espèce et/ou du stade.

Quatre des ces laboratoires ont toutefois répondu « trophozoïtes de *P. falciparum* » ; le cinquième laboratoire a répondu « *Plasmodium species* » (sans mentionner le stade).

Le pourcentage des globules rouges parasités varie fortement entre les laboratoires. Pas tous les laboratoires n'ont mentionné ce pourcentage. Pour les différents stades de *P. falciparum* nous avons calculé la médiane, le minimum et le maximum.

Tableau 5.2.4. Pourcentage des globules rouges parasités pour *P. falciparum*

Pourcentage des globules rouges parasités	Médiane	Minimum	Maximum
Trophozoïte	5	0,8	40
Schizonte jeune	1	0,001	7
Schizonte âgé	3	0,001	25
Gamétocyte	2,4	1	5

### 5.2.2 Echantillon P/4165

Au total 205 laboratoires ont participé à l'enquête. Les résultats sont repris dans le tableau 5.2.5.

Tableau 5.2.5. Aperçu des résultats pour l'échantillon P/4165

Parasite	Nombre
Négatif	200
<i>Plasmodium vivax</i>	2
<i>Bartonella species</i>	2
<i>Mansonella ozzardi</i>	1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1
<b>Total</b>	<b>205</b>

Il est à noter qu'un laboratoire a mentionné envoyer tous les frottis sanguins au centre de référence étant donné qu'il n'effectue que la détermination de l'antigène. Un autre laboratoire conseille d'effectuer l'analyse d'une goutte épaisse. Ces deux laboratoires ont néanmoins répondu que l'échantillon était négatif.

Il est également à mentionner qu'un laboratoire a proposé le diagnostic d'infection virale, sur base de la combinaison des données cliniques et de l'aspect négatif du frottis.

### **5.3. Commentaire**

#### **5.3.1 Echantillon P/4151 *Plasmodium falciparum* + ?**

##### **5.3.1.1. Informations cliniques**

Un Burkinabé de 21 ans habite depuis trois ans en Belgique. Après un voyage dans son pays d'origine il est de retour en Belgique depuis 3 semaines. Au moment de la prise de sang il souffre de fièvre, il a des frissons et une diarrhée.

Le résultat des thrombocytes était  $92 \cdot 10^9/l$ ; leur nombre descendra vers  $49 \cdot 10^9/l$ .

##### **5.3.1.2. Épidémiologie de la malaria en Afrique occidentale**

Les quatre espèces humaines de *Plasmodium* sont présentes en Afrique. Néanmoins *Plasmodium vivax* est absent en Afrique occidentale.

Le groupe sanguin Duffy, le récepteur de cette espèce, n'est quasiment pas retrouvé chez la population d'Afrique occidentale (1, 2). Par contre *Plasmodium ovale* est assez fréquente en Afrique occidentale. En Afrique du Nord (par exemple en Egypte) et en Afrique orientale (par exemple en Ethiopie) en revanche *P. vivax* est fréquemment retrouvé (2). *Plasmodium malariae* et surtout *Plasmodium falciparum* sont présents dans toute l'Afrique noire (sous-saharienne) (2). La résistance à la chloroquine de *P. falciparum* est largement répandue dans toute cette région (l'ancienne zone C de l'OMS); cette résistance complique la prophylaxie tant que la thérapie

#### **5.3.1.3. Microscopie**

Un pourcentage important des globules rouges (valeur médiane 5 % dans cette enquête) était parasité par des trophozoïtes jeunes annulaires (figure 5.3.1.1). Le diamètre de ces trophozoïtes était en certains cas moins d'un tiers du diamètre du globule rouge parasité (figure 5.3.1.1). Dans une minorité des échantillons on pouvait retrouver des schizontes (figure 5.3.1.2). Ces schizontes ont une dizaine de mérozoïtes.

Quelques caractéristiques importantes pour le diagnostic différentiel des quatre espèces humaines de *Plasmodium* sont reprises dans le tableau 5.3.1.1. Les granulations des globules rouges (Maurer, Schüffner) sont mieux visibles en utilisant un pH alcalin ; cette coloration n'est toutefois pas disponible dans la plupart des laboratoires.

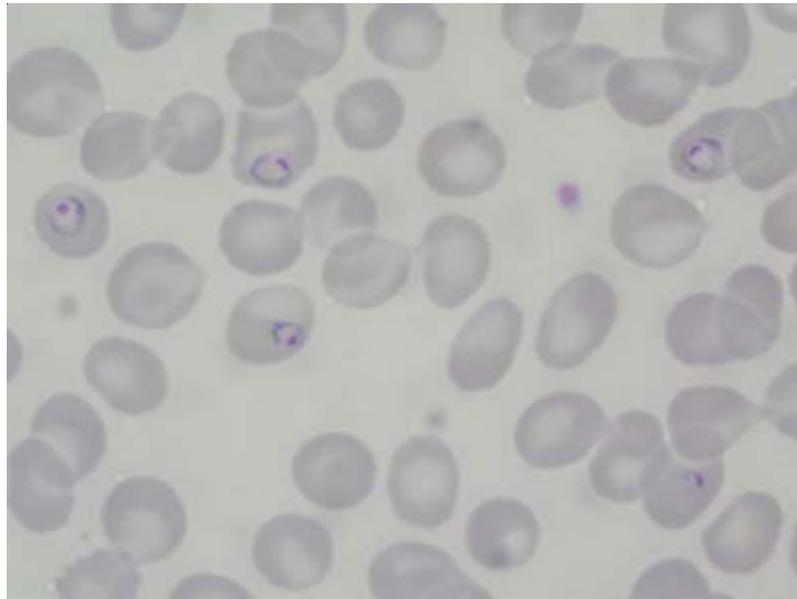


Figure 5.3.1.1: 5 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* (P/4151).

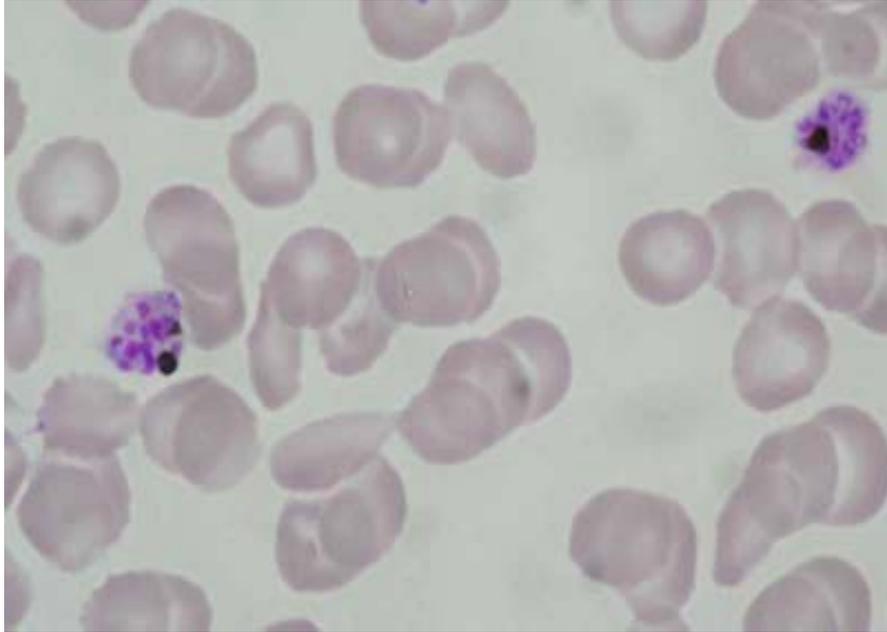


Figure 5.3.1.2: 2 schizontes de *Plasmodium* sp. (P/4151)

Tableau 5.3.1.1: Caractéristiques différentielles des 4 espèces humaines de *Plasmodium* (2, 3, 4)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
% GR parasités	Jusqu'à 40 % et plus	2 %	2 %	2 %
Dimension des hématies infestées	Taille normale	Taille augmentée	Taille augmentée	Taille diminuée
Trophozoïtes	Parfois 2 / GR; parfois 2 noyaux; formes « accolé »	1 / GR	1 (2) / GR	Formes en bande et pigment fréquents
Schizontes	Habituellement ils ne sont pas retrouvés dans le sang périphérique	12-24 mérozoïtes	6-12 mérozoïtes	6-12 mérozoïtes
Gamétocytes	En forme de croissant	Sphériques	Sphériques	Sphériques

On suppose que la parasitémie élevée dans les infections à *P. falciparum* est due au fait que ce parasite infecte tous les globules rouges, jeunes et mûrs.

#### 5.3.1.4. Discussion

Une thrombopénie est un indicateur de paludisme grave (1). La plupart des trophozoïtes sont petits (en comparaison avec les globules rouges) et délicats, ce qui est typique pour le *Plasmodium falciparum*. Ce diagnostic est confirmé par la parasitémie élevée. Les schizontes de *P. falciparum* (8-24 mérozoïtes ou plus) peuvent être retrouvés dans de rares cas dans le sang périphérique (4). Des infections à plusieurs espèces sont présentes dans 5 à 7 % des cas (1). Ces schizontes (en Afrique occidentale) peuvent être en principe *P. ovale* ou *P. malariae*. La sérologie du paludisme n'a pas été effectuée pour ce patient. Une autre possibilité aurait été d'effectuer un test de PCR spécifique par espèce. (5). Ce test de PCR n'est actuellement pas disponible en Belgique mais est en développement à l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers.

Les experts sont, après consultation de collègues externes spécialisés, d'avis que sur base des données disponibles il est impossible d'éliminer la possibilité d'une infection à *P. falciparum* avec une autre espèce. Le diagnostic *P. falciparum* est néanmoins de la plus grande importance puisque cette espèce peut être mortelle.

L'identification exacte de l'espèce est également importante pour le traitement et pour la prévention des récurrences tardives. En cas de doute on supposera évidemment que *P. falciparum*, avec un risque substantiel de résistance à la chloroquine, est présent. *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* ont une phase hépatique persistante (hypnozoïtes), qui peut être à la base des récurrences tardives. L'identification de ces espèces est utile afin de pouvoir effectuer un traitement radical (avec la primaquine).

Il est souhaitable d'envoyer les échantillons positifs au laboratoire de référence à l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers.

M. Lontie (MCH, Leuven) et K. Vernelen (WIV, Brussel)

## REFERENCES

1. Krogstad D. J. 2000. *Plasmodium species (malaria)*. In Mandell G. et al. (eds.). Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York: 2817-2831.
2. Ripert C., Pajot F.X. 1996. Paludisme. In Ripert C. et al. (eds). Epidémiologie des maladies parasitaires. Editions Médicales Internationales, Cachan Cedex: Tome 1:69-180.
3. Rogers W. O. 2003. *Plasmodium and Babesia*. In Murray P. et al. (eds.). Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC: 1994-1959.
4. Wilcox A. 1960. Manual for the microscopical diagnosis of malaria in man. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington.
5. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Malaria.htm>

## VI. SEROLOGIE

### 6.1. Syphilis

#### 6.1.1. Description de l'échantillon

Un échantillon a été envoyé :  
l'échantillon S/2102, sur lequel devrait être  
déterminé les anticorps anti-syphilis et l'ASLO.

L'échantillon était accompagné des  
informations cliniques suivantes :  
Un patient consulte son médecin pour des  
raisons de rash et de fièvre.

#### 6.1.2. Les participants

Au total 203 laboratoires ont pris part à cette  
enquête. Ils ont effectué 424 tests. Quinze  
laboratoires ont effectué un test, 160 ont  
effectué 2 tests, 23 ont effectué 3 tests et  
5 laboratoires ont effectué 4 tests.

#### 6.1.3. Réactifs utilisés

Le tableau suivant illustre le nombre  
d'utilisateurs des différentes trouses:

Fabriquant	Trousse	Nombre
Abbott	Determine Syphilis TP	1
Alphadia	FTA-ABS	1
Axis-Shield	Microsyph TP	7
	Syphscreen RPR	11
Becton Dickinson	MacroVue RPR Card Test	14
	VDRL Cardioliipin Ag	1
Biokit	RPR	12
	Syphagen TPHA	14
bioMérieux	RPR-Slide Test	35
	TPHA-nosticon	1
	Trepo-Spot IF	29
Bouty	EIA Syphilis IgM Cattura	1
Dade Behring	Cellognost Syphilis H Combipack	13
	Enzygnost Syphilis	14
	VDRL Cardioliipin Ag	4
Diagast	Sypal CB	2
	VDRL Microgast	2
DiaSorin	EPI-TREPONEMA SCREEN	3
Eurobio	TPHA	1
Euroimmun	Treponema pallidum IgG	2
Forlab	Syphscreen EIA	3
	TPHA Test kit	1
Fujirebio	Serodia TPPA	108
	Serodia TPPA auto	1
Innogenetics	Inno TPHA	4
Lameris	RPR	1
Lorne Laboratories	TPHA kit	1
Medigal	RPR Latex	1
Mikrogen	Recomblot IgG	1
	Recomblot IgM	1
	Recomwell IgG	1
	Recomwell IgGM	1
Murex	Murex Syphacard-R	45
	Murex TPHA	3
	Murex VDRL Carbon antigen	2
	Wellcosyph HA	23
New Market Laboratories Ltd.	TPHA 200	1
Omega	Immutrep Carbon Antigen	1
	Immutrep RPR kit	9
	Immutrep TPHA kit	4
Oxoid	TPHA test	2
	VDRL Carbon Antigen	2
Reaction Spinreact	RPR Carbon	39
Servibio	Servitex TPHA	1
<b>Total</b>		<b>424</b>

#### 6.1.4. Résultats

L'ensemble des résultats se répartit comme suit :

Résultats	Nombre
Négatif	416
Borderline	4
Positif	3
Pas de réponse	1
<b>Total</b>	<b>424</b>

Les résultats borderline ont été trouvés par 3 laboratoires :

- un laboratoire a obtenu deux fois un résultat borderline et ceci avec deux trousseaux différentes : le Macrovue RPR Card Test (Becton Dickinson) et le test Murex TPHA
- un laboratoire a obtenu un résultat borderline avec le Syfacard-R (Murex) et un résultat positif avec le test Murex TPHA
- un troisième laboratoire a obtenu un résultat borderline avec le Syfacard-R (Murex) et des résultats négatifs avec l'Inno-TPHA (Innogenetics) et le Trepo-Spot IF (bioMérieux)

En outre du résultat positif mentionné ci-dessus, les deux autres résultats positifs étaient obtenus par :

- un laboratoire qui a obtenu un résultat positif avec le Trepo-Spot IF (bioMérieux) et des résultats négatifs avec le Syfacard-R (Murex) et le Serodia-TPPA (Fujirebio)

- un laboratoire, qui n'a effectué qu'un test, le Syphscreen RPR (Axis-Shield), et a obtenu un résultat positif

Le laboratoire qui n'a pas donné de réponse, a mentionné que le test n'était pas interprétable et a posé la question de savoir s'il s'agissait d'un problème de matrice.

Interprétation	Nombre
Absence d'anticorps	195
Présence d'anticorps : un diagnostic de syphilis aiguë doit être éliminé sur base de données cliniques, anamnèse et profil sérologique du suivi.	4
Pas d'interprétation	4
<b>Total</b>	<b>203</b>

Les 4 réponses « présence d'anticorps » ont été proposées par les laboratoires qui avaient obtenu un résultat positif et/ou borderline. Le laboratoire, qui avait obtenu un résultat borderline et deux résultats négatifs, a néanmoins répondu « absence d'anticorps ». Un laboratoire qui a répondu qu'une syphilis aiguë devrait être éliminée, a mentionné, qu'en outre des données cliniques, anamnèse et profil sérologique du suivi, des réactions croisées devraient être exclues également (étant donné que ces réactions croisées peuvent provoquer des résultats faux positifs en FTA).

Outre le laboratoire mentionné ci-dessus qui a rencontré des problèmes d'interprétation, trois autres laboratoires n'ont pas donné d'interprétation. Ces laboratoires ont toutefois obtenu des résultats négatifs mais ont probablement oublié de compléter le formulaire de réponse.

Un tableau récapitulatif vous est donné ci-dessous :

Positif	Borderline	Négatif
1 labo (P) Syphscreen	1 labo (P) Macrovue RPR cardtest MUREX TPHA	
	1 labo (P)	1 labo (A)
MUREX TPHA	Syphacard-R	Inno TPHA Trepotspot IF
	1 labo (P)	
Trepotspot IF		Syphacard-R

Type d'interprétation : (A) = absence d'anticorps; (P) : présence d'anticorps

### 6.1.5. Discussion des résultats de l'enquête

L'agent causal de la syphilis, une infection transmise généralement par des contacts sexuels, est le pathogène humain *Treponema pallidum*.

Le diagnostic de la syphilis peut être établi sur base de données cliniques, de la détection des spirochètes dans une lésion, du résultat d'un test sérologique ou, plus récemment, de la détection de l'ADN de *Treponema pallidum*.

#### 6.1.5.1. Diagnostic de syphilis dans le laboratoire

Un aperçu des tests diagnostiques pour la détection de la syphilis, les plus fréquemment utilisés, sont repris dans le tableau suivant.

Tableau 6.1.5.1. Aperçu des tests diagnostiques pour la détection de la syphilis

##### 1. Détection des tréponèmes

- microscopie en fond noir
- immunofluorescence directe avec un conjugué spécifique anti-*Treponema pallidum*

##### 2. Détection des anticorps

###### 2.1. Anticorps *Treponema* non spécifiques

- Venereal Disease Research Laboratory test (VDRL)
- Rapid Plasma Reagin test (RPR)

###### 2.2. Anticorps *T. pallidum* spécifiques

- tests de micro-agglutination indirecte où les antigènes spécifiques sont fixés à des globules rouges ou autres porteurs comme les particules de gélatine colorées
- tests d'immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps IgG et/ou IgM
- tests immuno-enzymatiques pour la détection des anticorps IgG et, dans une moindre mesure, les anticorps IgM
- tests blot ou LIA (Line Immuno Assays) pour la détection des anticorps IgG ou IgM (surtout utilisés comme tests de confirmation)

##### 3. Polymerase Chain Reaction (PCR) pour la détection de l'ADN de *T. pallidum* (utilisé actuellement comme test de confirmation).

Actuellement une grande gamme de tests pour la détection des anticorps contre la syphilis est sur le marché; nous avons également constaté ce fait en analysant les réactifs utilisés par les différents laboratoires (voir tableau 6.1.3.)

Aux Etats-Unis on utilise avant tout le VDRL et le RPR comme tests de screening pour la syphilis. En Europe nous recherchons plus tôt les anticorps spécifiques (TPHA, TPPA, FTA, EIA) ou nous effectuons un screening avec les deux méthodes (démontré clairement dans cette enquête).

Plusieurs tests d'EIA sont mis sur le marché récemment en tant que tests de screening. Ces méthodes ont l'avantage qu'une grande diversité d'antigènes (extraits totaux, fractions purifiés, antigènes recombinants, peptides synthétiques) peuvent être fixés au porteur en plastique.

Comme en immunofluorescence, un conjugué spécifique IgM ou IgG peut également être utilisé.

Le tableau 6.1.3 montre que dans cette enquête 6% des analyses ont été effectuées avec une méthode EIA.

### 6.1.5.2. Interprétation des résultats

La performance d'un test dépend naturellement de sa spécificité, de sa sensibilité et des valeurs prédictives. Ces valeurs prédictives sont, à leur tour, liées à la prévalence de la maladie dans la population analysée.

Tableau 6.1.5.2 donne un aperçu de la littérature au sujet de la sensibilité des différents tests sérologiques.

Tableau 6.1.5.2. Sensibilité des tests sérologiques en syphilis non-traitée.

Test sérologique	Sensibilité % par stade			
	S1	S2	S3	S4
VDRL	75	100	95	71
RPR	83	100	98	73
FTA-ABS	84	100	100	96
TPHA-TP	76	100	97	94
TPHA-TP				
ELISA-TP				

S1 stade primaire  
S3 stade latente

S2 stade secondaire  
S4 stade tertiaire

Si la syphilis est traitée correctement le VDRL ou RPR deviendra négatif après au maximum 1 an. 80% des tests spécifiques continuent à donner un résultat positif pour la vie.

En ce qui concerne l'enquête actuelle nous pouvons supposer qu'au plus mauvais cas 8 (1.9%) résultats faux positifs ont été obtenus sur un total de 424 analyses.

Il existe un consensus que, indépendamment de la méthode utilisée dans le dépistage, un résultat positif doit être confirmé. En effet, des résultats faux positifs ont été décrits dans plusieurs cas comme des maladies auto-immunes, la borréliose, le VIH, des affections malignes, des maladies hépatiques chroniques, la malaria, la grossesse,...

Actuellement quelques tests de blot- et de LIA ont reçu des évaluations favorables dans la littérature. Ces tests utilisent souvent des antigènes recombinants et des peptides synthétiques.

Malgré qu'un échantillon négatif ait été envoyé dans cette enquête, quelques laboratoires ont néanmoins effectué des tests de confirmation.

Le FTA-abs a longtemps été accepté comme test de confirmation mais avec l'accroissement de la maladie de Lyme, des faux positifs FTA-abs ont été constatés. Dans notre laboratoire nous avons détecté dans une série de 25 séra Lyme-positifs, jusqu'à 20% de FTA-abs faux positifs. Le TPHA-TP était négatif.

T. Vervoort, Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerpen

## REFERENCES

1. A.Ebel et al. Validation of the INNO-LIA *syphilis* kit as a confirmatory assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J-Clin-Microbiol.* 2000 Jan; 38(1) : 215-9
2. H.Liu et al. New tests for *syphilis*: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J-Clin-Microbiol.* 2001 May; 39(5) : 1941-6
3. J.L.Backhouse and S.I.Nesteroff *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for *syphilis*. *Diagn-Microbiol-Infect-Dis.* 2001 Jan; 39(1) : 9-14
4. S.A.Larsen and W.E.Morrill. 1998. *Syphilis* in Clinical Diagnostic Immunology. Protocols in Quality Assurance and Standardisation p.353-361 ed. by R.M.Nakamura et al. Blackwell Science, London
5. M.L.Turgcon. 1996 *Syphilis* Immunology and Serology in Laboratory Medicine. P.197-214 Second Edition, Masby-Year Book St.Louis
6. B.L.Schmidt et al. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary *syphilis*. *J-Clin-Microbiol.* 2000 Mar; 38(3): 1279-82

## 6.2. ASLO

### 6.2.1. Description des échantillons

Un échantillon a été envoyé : l'échantillon S/2102, sur lequel devrait être déterminé les anticorps anti-syphilis et l'ASLO.

L'échantillon était accompagné des informations cliniques suivantes :  
Un patient consulte son médecin pour des raisons de rash et de fièvre.

### 6.2.2. Les participants

206 laboratoires ont pris part à cette enquête. Deux laboratoires ont effectué deux tests différents : 208 tests ont donc été effectués.

### 6.2.3. Réactifs utilisés

Le tableau suivant illustre le nombre d'utilisateurs des différentes trousse:

Fabriquant	Trousse	Nombre
ABX Diagnostics	ASO	1
APTEC Diagnostics	Anti Streptolysine O Reagent	9
Beckman	Array ASO	15
	Image ASO	6
	Synchron Anti-streptolysine O	5
	Non précisé	3
Biokit	Quantex ASO Plus	3
bioMérieux	ASL-kit	2
	ASL-slidex	1
Dade Behring	Antistreptolysin O Serum Standardized	1
	Cellognost ASL Micro	1
	N Latex ASL	26
	Rapitex ASL	5
	Rapitex ASL Combipack 150	1
	Streptolysin O Reagent Reduced	4
	Turbiquant ASL	3
	Non précisé	1
Fujirebio	Serodia ASO	12
Olympus	System Reagent Anti Streptolysin O	3
Omega	Avitex ASO	1
Roche	Cobas Integra 100 Tinaquant ASLO	1
	Cobas Integra 400 Tinaquant ASLO	14
	Cobas Integra 700 Tinaquant ASLO	5
	Cobas Integra 800 Tinaquant ASLO	15
	Cobas Integra Tinaquant ASLO <sup>1</sup>	1
	Hitachi 911 Tinaquant ASLO	2
	Hitachi 912 Tinaquant ASLO	8
	Hitachi 917 Tinaquant ASLO	13
	Modular Tinaquant ASLO	13
	Tinaquant ASLO <sup>2</sup>	32
	Non précisé	1
<b>Total</b>		<b>208</b>

- <sup>1</sup> Un participant a mentionné Cobas Integra sans mentionner le type de l'appareil.  
<sup>2</sup> Plusieurs participants ont mentionné utiliser Tinaquant ASLO sans mentionner l'appareil (Tinaquant ASLO peut être utilisé sur tous les appareils de la compagnie Roche) ou en mentionnant que la trousse a été utilisée sur un appareil d'une autre compagnie.

#### 6.2.4. Résultats

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous:

Résultat	Nombre
Négatif	201
Borderline	1
Positif	3
Pas de réponse	1
<b>Total</b>	<b>206</b>

Les résultats quantitatifs n'ont pas été mentionnés par tous les participants ; dans un certain nombre de cas le résultat est exprimé comme étant plus petit que la valeur de cut-off.

Pour les deux méthodes les plus utilisées où la plupart des participants ont mentionné le résultat quantitatif, nous avons calculé la médiane, le minimum et le maximum.

Méthode	Nombre de participants ayant mentionnés le résultat qualitatif	Médiane	Minimum	Maximum
N Latex ASL (Dade Behring)	21	53	46	101
Tinaquant ASLO (Roche); tous les appareils confondus	96	46	31,4	77

Les laboratoires ayant obtenu une réponse discordante ou n'ayant pas donné une réponse, ont tous mentionné le résultat quantitatif.

Les laboratoires ayant donné la réponse « positif » ont obtenu les résultats suivants :

- 36 U/ml (Cobas Integra 400)
- 38 U/ml (Cobas Integra 800)
- 68 U/ml (N Latex ASL)

Le laboratoire ayant répondu « borderline » a obtenu un résultat de 41 avec la méthode Quantex ASO Plus (Biokit) (les 2 autres utilisateurs de cette méthode, qui ont répondu « négatif », ont respectivement obtenu des valeurs < 50 et 56 U/ml).

Le laboratoire qui n'a pas répondu si le résultat était positif ou négatif, a obtenu une valeur de 40 U/ml (Tinaquant ASLO).

## 6.2.5 Discussion des résultats de l'enquête

### 6.2.5.1. Introduction

Streptococcus pyogènes (streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A) cause un certain nombre d'infections à haute prévalence dont les plus fréquentes sont les pharyngites et les infections cutanées. Le rhumatisme articulaire aigu et la glomérulonéphrite sont des complications non suppuratives qui peuvent se produire après une infection à streptocoques du groupe A. Ces deux types de complications se produisent quelques semaines après le processus infectieux aigu et sont probablement d'origine auto-immune: l'hôte développe des anticorps contre certains constituants des streptocoques. Ces anticorps produisent des réactions croisées avec les tissus normaux de l'hôte.

Le diagnostic des infections aiguës est effectué par culture classique, ou par détection d'antigène. Les tests sérologiques sont inutiles dans le diagnostic des infections aiguës à streptocoques. En outre les tests de routine sur les anticorps anti-streptocoques n'ont pas de valeur pronostique pour les patients avec des pharyngites.

Le diagnostic des complications non suppuratives est basé sur un certain nombre de critères cliniques en combinaison avec une preuve d'une infection récente à streptocoques. Cette preuve d'une infection récente à streptocoques peut être basée sur une culture positive ou sur un test d'antigène positif. Etant donné que ces complications peuvent se produire des semaines ou des mois après une infection aiguë, on fait dans la plupart des cas appel à la sérologie pour confirmer une infection de streptocoques du groupe A.

L'interprétation des tests est parfois compliquée d'une part par le portage naturel de streptocoques et d'autre part par le possible positivité des ASLO en cas d'infection à streptocoques bêta C.

Il est donc clair que la sérologie des streptocoques ne devrait que rarement être effectué dans les laboratoires cliniques. Néanmoins la sérologie est abusivement utilisée. Vu cet usage excessif, il a déjà été envisagé d'enlever ce test de la nomenclature. Jusqu'à maintenant cela n'a pas encore été le cas mais la possibilité subsiste.

Une infection à streptocoques du groupe A induit une réaction immunologique dirigée contre les différents antigènes des streptocoques : anti-streptolysine O (ASLO), anti-déoxyribonucléase B (ADNase B) et anti-hyaluronidase (AH).

Trois semaines après une pharyngite à streptocoques 80% des enfants non traités montreront un ASLO ou ADNase B élevé. Si des anticorps contre plusieurs antigènes sont testés la sensibilité s'élève jusqu'à 95%. Après une infection cutanée la réaction immunitaire vis-à-vis de la streptolysine O est moins exprimée; d'autres antigènes (DNase B; hyaluronidase) induisent une meilleure réponse. L'administration des antibiotiques au début d'une infection aiguë peut supprimer la réaction immunitaire.

Le test utilisé le plus fréquemment dans la détection des anticorps contre les streptocoques du groupe A est le test de l'antistreptolysine O. Ce test mesure les anticorps contre la streptolysine O (enzyme spécifique des streptocoques qui lyse les globules rouges). Le test détermine dans quelle mesure le sérum du patient peut empêcher la lyse des globules rouges. Afin de établir le diagnostic nous rechercherons donc la présence d'un titre en augmentation ou d'un titre élevé en anticorps ASLO.

**6.2.5.2. Commentaires concernant les résultats de l'enquête**

L'échantillon envoyé ne contenait pas de titre notable d'ASLO. Le diagnostic d'infection à streptocoques passée ne pouvait donc être établi grâce aux valeurs retrouvées. Les résultats des laboratoires étaient tous du même ordre. L'interprétation correcte de la sérologie devrait donc être : titre non suggestif d'une infection récente à streptocoques.

Cette possibilité n'était pas prévue dans les réponses et la plupart des laboratoires ont donc interprété le résultat comme négatif. Un laboratoire a répondu borderline et trois laboratoires ont considéré l'échantillon comme positif.

Etant donné que les valeurs quantitatives de ces quatre laboratoires étaient comparables à celles des autres laboratoires, il n'est pas question de technique ou analyse fautive, mais plus tôt d'une autre interprétation. D'autres options de réponse auraient pu éviter ces divergences.

A. Naessens, AZ VUB, Jette